

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN05/000226

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN  
Number: 200410023827.0  
Filing date: 24 March 2004 (24.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 May 2005 (24.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

# 证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2004. 03. 24

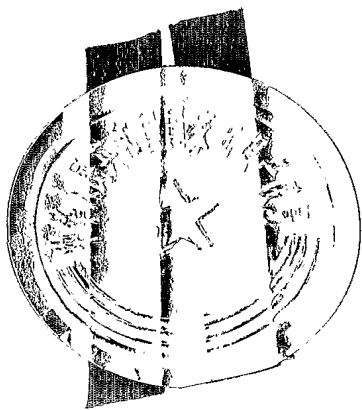
申 请 号： 200410023827. 0

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 褐藻酸寡糖在抗痴呆、抗糖尿病中的应用

申 请 人： 中国海洋大学

发明人或设计人： 耿美玉、辛现良、杨钊、管华诗、孙广强、胡金凤、范莹



中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王景川

2005 年 4 月 11 日

## 权利要求书

4

1. 褐藻酸寡糖用于制作抗老年性痴呆药物。
2. 褐藻酸寡糖用于制作抗糖尿病药物。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的药物，其特征是所述的褐藻酸寡糖为还原端 1 位为羧基的古罗糖醛酸寡糖、还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖或还原端 1 位为羧基的甘古糖醛酸寡糖。

## 褐藻酸寡糖在抗痴呆、抗糖尿病中的应用

### 技术领域：

本发明涉及一种褐藻酸寡糖在治疗老年性痴呆和糖尿病方面的应用。

### 背景技术：

老年性痴呆和糖尿病是目前严重危害人类健康的多发病和常见病，尤其是随着世界老年人口的日益增多，其发病率有逐年升高的趋势，因此老年性痴呆和糖尿病的防治显得越来越重要。目前用于老年性痴呆的防治药物包括中枢兴奋剂、改善胆碱能的物质、脑血液循环改善剂、中草药及吡咯烷酮类化合物等，多存在疗效不确切、特异性不强，或毒副作用大、口服吸收差、不易透过血脑屏障，特别是治标不治本的缺点，限制了他们的广泛应用。而临床常用的糖尿病防治药物主要包括胰岛素和口服降糖药物，多存在使用不便及毒副作用大等缺点，尤其是缺乏合适的用于II型糖尿病的有效药物。

### 发明内容：

本发明的目的是提供一种具有抗老年性痴呆和糖尿病作用的褐藻酸寡糖，以弥补现有技术上的不足。

褐藻酸寡糖用于制作抗老年性痴呆药物。

褐藻酸寡糖用于制作抗糖尿病药物。

本发明的药物能大规模生产，价格低廉，用于制备抗老年性痴呆和糖尿病药物。

### 附图说明及具体实施方式

附图1为还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖缩短痴呆动物寻找平台潜伏期图。

附图2为还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖缩短痴呆动物寻找平台游泳路程图。

附图3为还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖缩短痴呆动物第一次到达原平台图。

附图4为还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖增加痴呆动物穿越原平台次数图。

附图5为还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖保护胰淀素损伤胰岛β细胞图。

本申请人在申请号为03138966.X、03138976.7、03138967.8的中国专利中分别披露了三种还原端1位为羧基褐藻酸寡糖的制备方法，用该方法制造出来的褐藻酸寡糖分别为还原端1位为羧基的古罗糖醛酸寡糖、还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖及还原端1位为羧基的甘古糖醛酸寡糖。这些寡糖均能大规模生产，价格低。经进一步实验得知，这些寡糖具有抑制老年性痴呆和糖尿病的作用。

### 实施例一 褐藻酸寡糖抗老年性痴呆疗效观察

采用东莨菪碱腹腔注射所致痴呆的大鼠,观察了药物对痴呆动物学习记忆功能及相关生化指标的影响,结果表明,还原端 1 位为羧基的古罗糖醛酸寡糖、还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖及还原端 1 位为羧基的甘古糖醛酸寡糖均能明显改善痴呆大鼠的学习记忆功能,明显升高痴呆大鼠大脑皮层及海马内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、ATPase 等酶的活性,降低丙二醛(MDA)的含量。表明原端 1 位为羧基的古罗糖醛酸寡糖、还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖及还原端 1 位为羧基的甘古糖醛酸寡糖对老年性痴呆具有明显的治疗作用。

下面以还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖为例对实验材料与方法以及实验结果作详细说明。

## 材料和方法

### 1. 药品与试剂

哈伯因由河南竹林众生制药公司豫中制药厂生产。氢溴酸东莨菪碱注射液(批号 020601)由上海禾丰制药有限公司提供;SOD、GSH-PX 和 ATPase 试剂盒购自南京建成。

### 2. 实验仪器

Morris 水迷宫由中国医学科学院药物研究所设计制作。

### 3. 实验动物

Wistar 大鼠,雄性,体重 220~250g,由山东大学实验动物中心提供。

## 实验方法

### 1. 给药方案

取大鼠 60 只,随机分为六组:对照组、模型组、还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖 40、120、360mg/kg 组及阳性药哈伯因 40  $\mu$ g/kg 组,每组 10 只。除对照组和模型组用生理盐水灌胃外,其它各组给予相应药物,连续给药 37 天。

### 2. Morris 水迷宫行为测试

#### (1) 定位航行实验:

从第 31 天开始进行定位航行实验,连续测试 5 天。每次试验前 30min 腹腔注射东莨菪碱,注射量为 0.75mg/kg,每天一次,将大鼠分别从两个固定入水点面向池壁放入水中,记录在 2min 内寻找平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路程。

#### (2) 空间探索实验:

定位航行实验结束后,间隔 1 天,撤去平台,将大鼠从一个入水点放入水中,测其 2min 内在原平台所在象限的游泳时间。

### 3. 生化指标测定

游泳实验结束后将动物断头处死,立即于冰上分离皮层和海马,经液氮速冻 1 小时后放入-80℃冰箱保存。实验时将皮层和海马分别用生理盐水制成 10% (重量百分浓度,下同)和 5%匀浆,以 3600 转/分的速度离心分离,将上清液进行 MDA、CuZn-SOD、GSH-PX、

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase 活性测定, 均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。

### 统计学处理

应用 SPSS 统计处理软件进行统计分析, 结果以“均值±标准误”(M±SE)表示, 采用方差分析(ANOVA)和 t 检验进行比较。

### 实验结果

#### 1、行为学

##### (1) 定位航行实验结果

由附图 1 和附图 2 可以看出, 随着训练时间的延长, 大鼠游泳潜伏期和游泳路程逐渐缩短, 并且从第二天开始, 东莨菪碱模型组与正常组相比, 大鼠游泳逃避潜伏期和游泳路程明显延长 ( $p<0.01$ ); 在训练的第五天还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖组和哈伯因组同模型组相比, 大鼠的逃避潜伏期和游泳路程明显缩短, 表明还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖可明显增强痴呆动物的学习能力。

##### (2) 空间探索实验结果

由附图 3、4 可以看出, 在撤出平台后, 东莨菪碱模型组同正常对照组相比, 大鼠在原平台所在象限的游泳时间明显缩短, 穿越原平台次数明显增加 ( $p<0.01$ ), 而还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖给药组和阳性药哈伯因组大鼠在原平台所在象限的游泳时间明显延长 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ), 表明还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖可明显增强痴呆动物记忆能力。

#### 2、生化实验测定结果

##### (1) 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致记忆障碍大鼠海马及皮层中 ATP 酶活性的影响。

与东莨菪碱组相比, 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖可明显升高东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠海马及皮层 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) (见表 1)。

表 1. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠海马和皮层 Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATP 酶活性 (umolpi / mg.prot. hr)	
		海马	皮层
对照	—	8.67±0.40	6.72±0.13
模型	—	4.90±0.21 <sup>###</sup>	4.12±0.44 <sup>###</sup>
还原端 1 位	40	8.06±0.37 <sup>***</sup>	6.62±0.25 <sup>***</sup>
为羧基甘露	120	6.30±0.57 <sup>**</sup>	6.97±0.45 <sup>***</sup>
糖醛酸寡糖	360	8.35±0.54 <sup>***</sup>	5.71±0.33 <sup>***</sup>
哈伯因	0.04	7.04±0.45 <sup>***</sup>	6.50±0.21 <sup>***</sup>

<sup>###</sup>  $p<0.001$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup>  $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P<0.01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $P<0.001$ , 与模型组比较

(2) 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致记忆障碍大鼠大脑皮质和海马中 SOD 活性的影响。

如表 2 所示, 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖均可提高东莨菪碱所致记忆障碍大鼠大脑皮质和海马中的 SOD 活性 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ )。

表 2. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠海马和皮层 CuZn-SOD 比活力的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	CuZn-SOD 比活力 (NU/mg.prot.)	
		海马	皮层
对照	—	127.83 $\pm$ 7.34	125.71 $\pm$ 8.32
模型	—	118.55 $\pm$ 4.95 <sup>##</sup>	115.54 $\pm$ 8.13 <sup>##</sup>
还原端 1 位为羧基甘露糖醛酸寡糖	40	124.67 $\pm$ 7.25 <sup>*</sup>	130.47 $\pm$ 8.94 <sup>***</sup>
	120	119.54 $\pm$ 7.42	148.14 $\pm$ 9.74 <sup>***</sup>
	360	126.03 $\pm$ 6.80 <sup>**</sup>	139.20 $\pm$ 7.79 <sup>***</sup>
哈伯因	0.04	128.80 $\pm$ 8.33	114.10 $\pm$ 5.97

<sup>##</sup> $P<0.01$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ , 与模型组比较

(3) 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致记忆障碍大鼠海马及皮质中 GSH-PX 活性的影响。

如表 3 所示, 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖可提高东莨菪碱所致记忆障碍大鼠大脑皮质中 GSH-PX 的活性 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。

表 3. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠海马和皮层 GSH-PX 活力的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	GSH-PX 活力 (U/mg.prot.)	
		海马	皮层
对照	—	6.13 $\pm$ 0.44	8.33 $\pm$ 0.18
模型	—	5.63 $\pm$ 0.38	7.18 $\pm$ 0.29 <sup>##</sup>
还原端 1 位为羧基甘露糖醛酸寡糖	40	6.37 $\pm$ 0.33	9.54 $\pm$ 0.61 <sup>**</sup>
	120	5.72 $\pm$ 0.30	8.97 $\pm$ 0.61 <sup>*</sup>
	360	6.07 $\pm$ 0.38	8.45 $\pm$ 0.48 <sup>*</sup>
哈伯因	0.04	6.30 $\pm$ 0.29	8.20 $\pm$ 0.40 <sup>*</sup>

<sup>##</sup> $p<0.01$ , 与对照组比较; <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , 与模型组比较

(4) 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致记忆障碍大鼠海马及皮质中

## MDA 含量的影响.

9

如表 4 所示, 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖可降低东莨菪碱所致记忆障碍大鼠大脑海马中及皮层 MDA 的含量 ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ )。

表 4. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠海马和皮层 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ ,  $n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/ mg prot.)	
		海马	皮层
对照	—	2.35±0.21	3.25±0.11
模型	—	4.46±0.21 <sup>###</sup>	4.16±0.12 <sup>###</sup>
还原端 1 位为羧基	40	2.65±0.14 <sup>***</sup>	3.24±0.16 <sup>***</sup>
甘露糖醛酸寡糖	120	1.83±0.09 <sup>***</sup>	3.64±0.14 <sup>***</sup>
	360	1.17±0.05 <sup>***</sup>	2.69±0.16 <sup>***</sup>
哈伯因	0.04	2.48±0.18 <sup>***</sup>	4.36±0.11

<sup>###</sup> $p<0.001$ , 与对照组比较; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$ , 与模型组比较

## 实施例二 褐藻酸寡糖治疗糖尿病疗效观察

采用胰淀素 (IAPP) 导致的人胰岛  $\beta$  细胞 NIT 株损伤模型, 观察了褐藻酸寡糖的保护作用。结果表明, 褐藻酸寡糖可以明显改善 IAPP 对细胞的毒性作用, 增强细胞的存活, 并且随着药物剂量的增加, 这种改善作用越明显。表明褐藻酸寡糖具有拮抗 IAPP 对胰岛  $\beta$  细胞损伤的作用。

采用链脲霉素致 NIH 小鼠糖尿病模型, 观察了褐藻酸寡糖对糖尿病小鼠的治疗作用。结果表明, 给药组小鼠血糖浓度明显低于模型组, 说明褐藻酸寡糖对链脲霉素所致糖尿病模型小鼠具有一定的治疗作用。

下面以还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖为例对实验材料与方法以及实验结果作详细说明。

### 材料和方法

#### 1. 药品与试剂

胰淀素 (IAPP) 及链脲霉素均购自 SIGMA 公司。

#### 2. 实验动物

NIH 小鼠, 雄性, 体重 18-22 g, 由中国医学科学院动物所动物中心提供。

### 实验方法

人胰岛  $\beta$  细胞 NIT 株用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 细胞融合后, 加入 0、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$  还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖, 作用 24 小时, 加入终浓度为 30  $\mu\text{M}$  老化的胰淀素 (IAPP), 继续培养 48 小时后, 以 MTT



法测定细胞的存活。结果表明，还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖预处理 24 小时可以明显改善 IAPP 对细胞的毒性作用，增强细胞的存活，并且随着药物剂量的增加，这种改善作用越明显（附图 5），表明还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖具有拮抗 IAPP 对胰岛  $\beta$  细胞损伤的作用。

体重 18-22g 雄性 NIH 小鼠 60 只，随机分为正常组、模型组、还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖 50、150、450 mg/kg 组及优降糖 5mg/kg 组。试验当天，除正常组外，其余动物均腹腔注射链脲霉素 150mg/kg。连续给予相应药物 10 天，第 11 天摘眼球取血，测血糖浓度。结果表明，各给药组小鼠血糖浓度明显低于模型组，说明还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对链脲霉素所致糖尿病模型小鼠具有一定的治疗作用（见表 5）。

表 5. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对链脲霉素致糖尿病小鼠血糖的影响 ( $\bar{x} \pm SD$ , n=10)

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	血糖浓度 (mg/dL)
对照	—	10	150.6 $\pm$ 36.8
模型	—	10	312.4 $\pm$ 89.2 <sup>###</sup>
还原端 1 位为羧基的 甘露糖醛酸寡糖	50	10	219.4 $\pm$ 67.8 <sup>*</sup>
	150	10	179.6 $\pm$ 69.8 <sup>**</sup>
	450	10	162.5 $\pm$ 3 <sup>**</sup>
优降糖	5	10	201.6 $\pm$ 58.9 <sup>**</sup>

<sup>###</sup> P < 0.05, 与对照组比;    \* P < 0.05, \*\*p<0.01 与模型组比;

用还原端 1 位为羧基的古罗糖醛酸寡糖和还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖分别代替实施例 1 和实施例 2 种的还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖，在其它条件不变的条件下作了类似的实验，取得了类似的结果，这里就不再作详细的说明了。

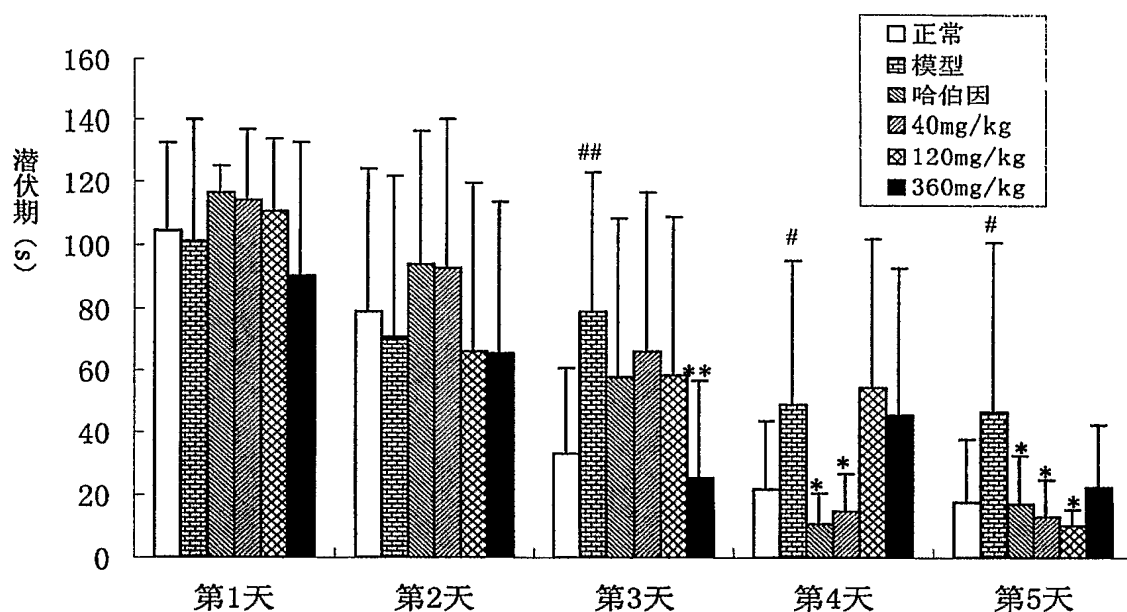


图 1. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠 Morris 水迷宫寻找平台潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ )  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , 与模型组比;  $^{*}P < 0.05$ , 与模型组比

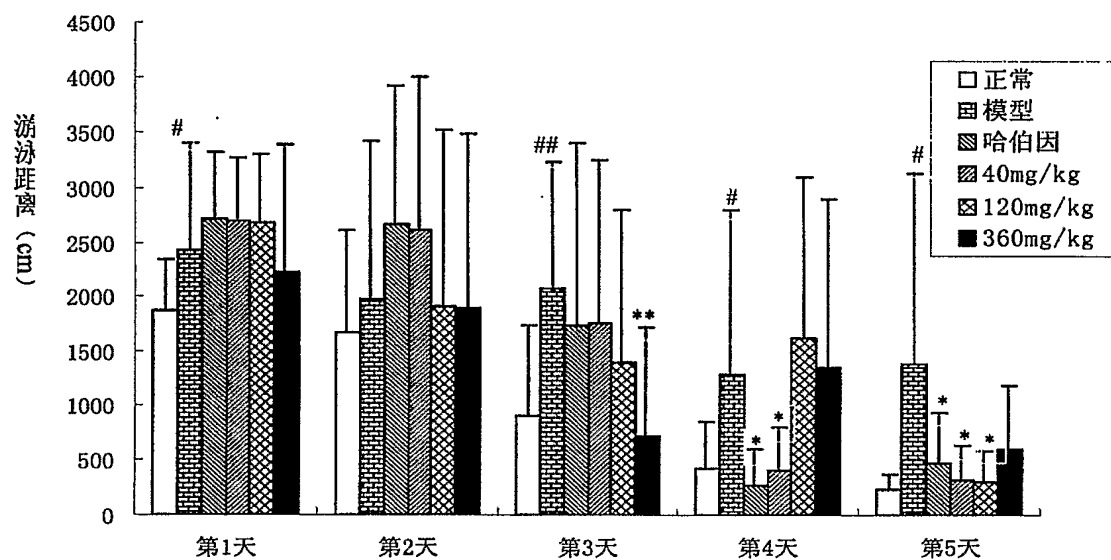


图 2. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠 Morris 水迷宫游泳距离的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ )  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ , 与模型组比;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.05$ , 与模型组比

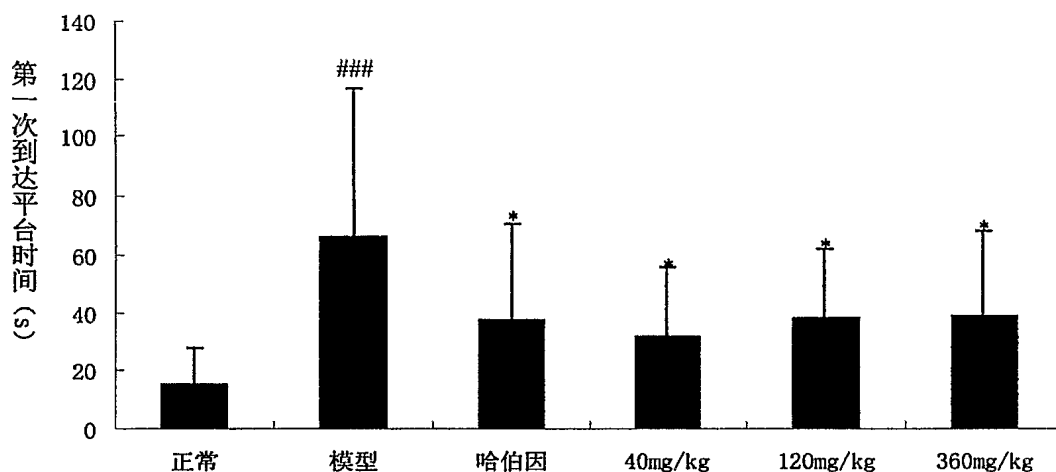


图3. 还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠 Morris 水迷宫第一次到达平台时间的影响 ### $p < 0.001$  vs 正常组, \* $p < 0.05$  vs 模型组 ( $\bar{x} \pm SE$ )

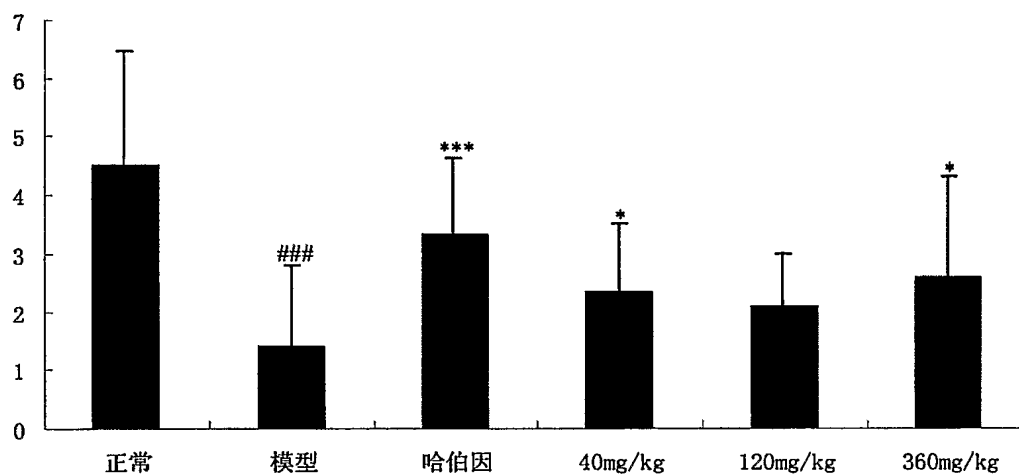


图4. 还原端1位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍大鼠 Morris 水迷宫穿越平台次数的影响 ### $p < 0.001$  vs 正常组, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs 模型组 ( $\bar{x} \pm SE$ )

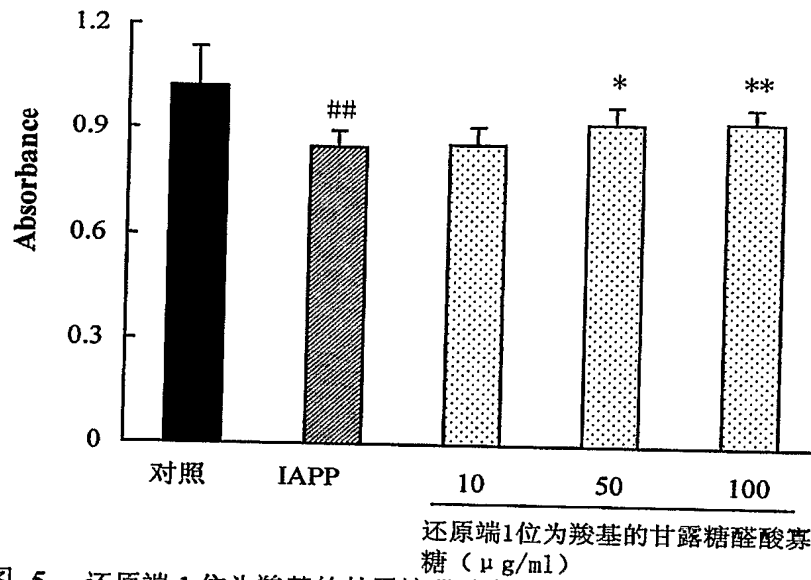


图 5. 还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖对 IAPP 引起 NIT 细胞损伤的保护作用  
##  $p < 0.01$  vs 对照, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs IAPP 组 ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ )